

## TRANSLATION CERTIFICATION

We, **AD-EX WORLDWIDE**, an industrial translation service founded in 1957, domiciled at 525 Middlefield Road, Suite 150, Menlo Park, California 94025-3458, USA, do hereby certify that:

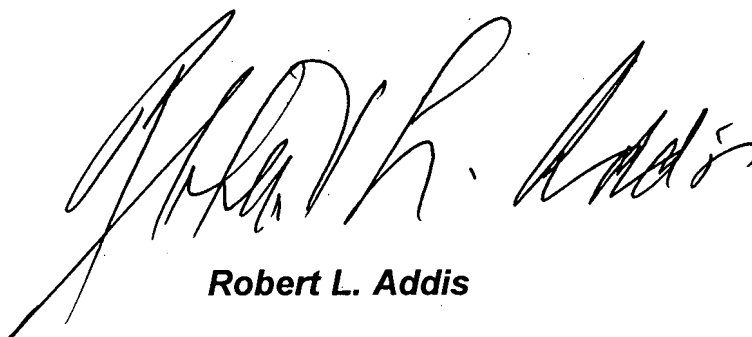
- we are internationally recognized professional translators from Japanese into English;
- we have been serving the public in that capacity since 1957;
- the attached 20-page English text, each of whose pages is identified by JP(A)59-93100, is a translation from Japanese to English entirely performed by us;
- said English translation from Japanese constitutes a complete and accurate description of the entire meaning of the printed portions of the original Japanese-language text identified as

***Japanese Patent Application Public Disclosure No. 59-93100***  
*(a 9-page document with pages numbered from 1189 to 1197)*

of which a copy is appended to this English translation.

So declared with such exceptions as may be indicated in the translation.

Thus certified for and on behalf of **AD-EX Worldwide** by its Certifying Officer:



**Robert L. Addis**

Int. Cl.<sup>3</sup>  
C 07 H 21 02  
21 04

識別記号

庁内整理番号  
7252-4C  
7252-4C

公開 昭和59年(1984)5月29日

発明の要  
害を請求 要請求

(全 9 頁)

オリゴヌクレオチド誘導体およびその製造法

特 願 昭58-204306  
出 願 昭57(1982)8月9日  
特 願 昭57-138136の分割  
発 明 者 三好健一  
広島県高田郡吉田町吉田1366-1

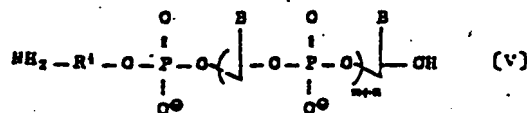
発 明 者 不破亨  
広島市中区小町6-17-602  
出 願 人 湧永製薬株式会社  
大阪市福島区福島三丁目1番39号  
代 理 人 弁理士 信設清 外2名

明 細 書

1. 発明の名称 オリゴヌクレオチド誘導体およびその製造法

2. 特許請求の範囲

1. 下式(V)で示されるものであることを特徴とする、オリゴヌクレオチド誘導体。



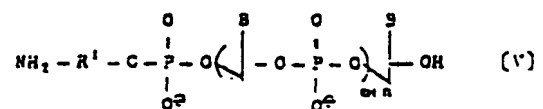
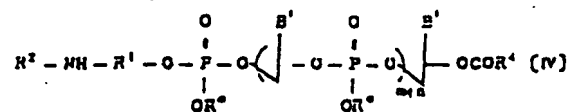
(ただし、 $m$ および $n$ はそれぞれ0または任意の自然数であり、 $\text{R}^1$ は二価の基または分岐鎖の炭化水素基であり、 $\text{B}$ はヌクレオチドを構成する塩基である( $\text{B}$ が炭素数存在するときは、それらに同一でも異なってもよい)。)

2. 塩基 $\text{B}$ がアデニン、グアニン、シトシンおよびチミンからなる群より選ばれたものである、特許請求の範囲第1項記載のオリゴヌクレオチド誘導体。

3.  $\text{R}^1$ が炭素数2-20の直鎖または分岐鎖のアルキレン基である、特許請求の範囲第1項または第2項記載のオリゴヌクレオチド誘導体。

4.  $m$ が0または6までの自然数、 $n$ が0または40までの自然数である、特許請求の範囲第1-3項のいずれか1項に記載のオリゴヌクレオチド誘導体。

5. 下式(IV)で示される化合物の5'-末端基以上のアミノ基の保護基 $\text{R}^2$ 、3'-末端の $\text{COR}^4$ 基、塩基部分およびリン酸部分の保護基をすべて除去することによって得られる、下式(V)で示されるオリゴヌクレオチド誘導体の製造法。



(ただし、 $m$ および $n$ はそれぞれ0または任意の自然数であり、 $\text{R}^2$ はリン酸基を保護する基)

基は、 $R^1$ は二価の両端または分岐部の炭化水素基であり、 $R^2$ はアミノ基の保護基であり、 $CCR^3$ 基はヌクレオチドの3'-末端炭素基の保護基であり、 $B'$ はヌクレオチドを形成する保護された塩基であって必要に応じて保護されたものであり、 $B$ はヌクレオチドを形成する塩基である( $B'$ または $B$ が複数個存在するときは、それらは同一でも異なってもよい)。

### 1. 発明の詳細な説明

#### 発明の背景

##### 技術分野

本発明は、一般に、新規オリゴヌクレオチド誘導体に関する。さらに具体的には、本発明は、ヌクレオチドの5'-末端リン酸基延長上に適度な長さのスペーサーを介して一級アミノ基を導入してなるオリゴヌクレオチド誘導体に関する。本発明は、また、このようなオリゴヌクレオチド誘導体の製造法にも関する。

工芸的研究に多大な寄与をするものである。

本発明者らは現在まで、オリゴヌクレオチドの有機化学的合成分野で相対的に有力な合成手段として、種々のオリゴヌクレオチドの合成を行なってその応用を検討してきたが、特にアフィニティクロマトグラフィー用樹脂あるいは非放射性アフィニティプローブを調製すべく鋭意努力を重ねた結果、これらの製造の際に有用な中間体であるオリゴヌクレオチド誘導体を見出した。

現在まで同様のものは市販されているアフィニティクロマトグラフィー用樹脂(Arch. Biochem. Biophys., 158, 561(1974)、J. Biochem., 83, 783(1978)、特開第52- 25795号、同53- 101396号、同53- 133283号および同55- 36277号各公報)や非放射性アフィニティプローブ(Proc. Natl. Sci. USA, 78, 6633-6637(1981))に用いられているオリゴヌクレオチド誘導体は、一般に合成がめんどろであるという共通の弱点をかかえている。

非放射性アフィニティプローブにおいては、シ

#### 先行技術

近年、核酸の化学合成に新しい技術の導入あるいはトリニステル法、ホスホニート法等の新しい融合系の開発により飛躍的に進歩している。また、遺伝子工学の急速な進歩とあいまって、核酸の化学合成がこの分野でも重要な役割をもつようになってきた。例えば人工遺伝子を合成し、遺伝子置換法操作を利用して有用物質の生産が行なわれている(インターフェロン: Nature, 281, 544(1979)、白血球由来インターフェロン: Nature, 287, 411(1980))。また、ハイブリッド法のためのプローブ(Nucl. Acids Res., 9, 879(1981))としてや mRNA あるいは一本鎖 DNA から逆転写酵素あるいは DNA ポリメラーゼによって、二本鎖 DNA を合成する際に必要な短い DNA に相補的な DNA 断片(プライマー)として利用(Nucl. Acids Res., 8, 4057(1980))等の応用例もある。

このように、核酸の有機化学的合成手段は、生体から分離できない特殊な配列をもつオリゴヌクレオチドの合成を可能にし、分子生物学、遺伝子トシン誘導体の合成が容易であり(上記文献より)、任意でかつ定められた塩基配列をもつ DNA の合成が困難である等の問題点がある。また、アフィニティ樹脂合成に際して下記に示す文献のものは、リガンドの合成に手間がかかる等の弱点がある。

J. Chromatog., 97, 33(1974)

Biochem. Biophys. Acta, 304, 231(1973)

Anal. Biochem., 71, 471(1976)

これらの理由によって、上記のプローブや樹脂合成の際に有用なオリゴヌクレオチド誘導体の提供が望まれているのが現状である。

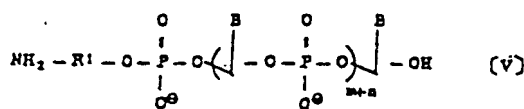
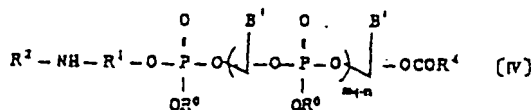
#### 発明の概要

##### 発明

本発明は上記の点に解決を与えることを目的とし、目的物にのみ限る親体を結合できる官能基(一級アミノ基)を、ヌクレオチドの5'-末端延長上に適度な長さのスペーサーを介して導入してなるオリゴヌクレオチド誘導体によってこの目的を達成しようというものである。

従って、本発明によるオリゴヌクレオチド誘導体は、下式(V)で示されるものであること、を特徴とするものである。

また、本発明による下式(V)で示されるオリゴヌクレオチド誘導体の製造法は、下式(IV)で示される化合物の5'-末端基長上のアミノ基の保護基R<sup>1</sup>、3'-末端基のCOR<sup>4</sup>基、塩基部分およびリン酸部分の保護基をすべて除去すること、を特徴とするものである。



〔ただし、mおよびnはそれぞれ0または任意の自然数であり、R<sup>0</sup>はリン酸基を保護する置換基で通常置換されたフェニル基であり、R<sup>1</sup>は二価の置換または分岐鎖の炭化水素置換基であり、R<sup>2</sup>はアミノ基の保護基であり、COR<sup>4</sup>基はヌクレオチドの3'

-末は水酸基の保護基であり、B'はヌクレオチドを構成する保護された塩基であって必要に応じて保護されたものであり、Bはヌクレオチドを構成する塩基である(B'またはBが互換的符号を有するときは、それらに同一でも異なってもよい)。〕

#### 効果

本発明による合成したオリゴデオキシリボヌクレオチドは、血球アフィニティクロマトグラフ、一用樹脂あるいは反相用非極性アフィニティプロープの担体を回収できるものであり、下記のような長所を有するものである。

(1) いかなる塩基配列をも有する上記樹脂やプロープを製造することができる。

(2) 合成が非常に簡単であって、大量合成が可能である。

(3) オリゴヌクレオチド中に存在する他の官能基(水酸基、リン酸基および塩基部分のアミノ基など)よりも反応性が高いので、保護したオリゴヌクレオチドを基質として担体との複合に用いることができる。すなわち、反応条件等の

設定により選択的にアミノ基部分と結合可能である。

(4) 固相法、液相法およびいかなる方法で合成されたオリゴヌクレオチドを固定化することが可能である。

#### 発明の具体的説明

##### オリゴヌクレオチド誘導体(V)

本発明によるオリゴヌクレオチド誘導体は、前記の式(V)で示されるものである。

式中、記号Bは、2'-デオキシリボヌクレオチドの3'-および5'-水酸基を除いたデオキシリボヌクレオチド残基を示すのに慣用されているものであって、具体的には下記の構造のものである。



置換基Bはヌクレオチドを構成する塩基を示し、通常はアデニン、チミン、シトシンまたはグアニンである。化合物(V)中にBが複数個存在するときは、それらに同一でも異なってもよい。

mおよびnは、それぞれ0または自然数を示す。

本発明オリゴヌクレオチド誘導体の重合度がm+nで表示されているのは、本発明の好ましい製造法で重合度がそれぞれmおよびnのフラクションを混合させていることによるものである(詳細後記)。その場合のmは実用的には0~6、特に1~4、nは実用的には0~40、特に0~20、である。

基R<sup>1</sup>は化合物(V)のヌクレオチド部分の5'-末はリン酸基とアミノ基部分とを連結する二価の置換または分岐鎖の炭化水素置換基である。これは、特に炭素数2~20程度の置換または分岐鎖のアルキレン基が適当である。好ましいR<sup>1</sup>は、炭素数2~6のアルキレン基である。

#### 化合物(V)の合成

##### 一般的説明

化合物(V)、すなわち本発明によるオリゴヌクレオチド誘導体は、合目的な塩基の方法によって合成することができる。

一つの好ましい方法は、前記の式(IV)のオリゴヌクレオチド誘導体、すなわちオリゴデオキシヌクレオチドの5'-末はリン酸基に基R<sup>1</sup>を介して保

特開昭59- 93100(4)

置された一級アミノ基を導入し、ヌクレオチドの塩基部分およびリン酸基部分が保護され、5'-末端に結合した水酸基の水素原子がCOR<sup>4</sup>基で置換されたもの、のすべての保護基を除去することからなるものである。

一方、式(IV)の化合物は、他の官能基部分が保護されたオリゴヌクレオチドの5'-水酸基延長上での保護された一級アミノ基の導入からなる方法で合成することができる。

第1図は、この好ましい合成法の一例を示すフローチャートである。フローチャート中の記号は、下記の意味を持つ(その意味ないし詳細は、後記した通りである)。

R<sup>0</sup> リン酸基を保護する置換基であって、通常オルトクロロフェニル基が用いられる。

R<sup>1</sup> 二価の鎖状または分枝鎖の炭化水素置換基である。

R<sup>2</sup> アミノ基の保護基であって、通常ジメトキシトリチル基が用いられる。

R<sup>3</sup> 他のすべての保護基が安定な条件で容易に脱

離されて、リン酸ジエステルを与えることができる置換基であって、通常シアノエチル基が用いられる。

COR<sup>4</sup> 通常のオリゴヌクレオチド合成法に用いられる5'-水酸基の保護基である。具体的には、R<sup>4</sup>が低級アルキル基、アリール基(特に、フェニル基、またはメチル置換フェニル)、あるいは固相合成法の際に用いられる適当なスベーターを持つ担体(ポリスチレン樹脂、ポリアミド樹脂)であるもの、がある。

R<sup>5</sup> 5'-末端水酸基の保護基であって、通常メトキシトリチル基が用いられる。

m 0または任意の自然数。

n 0または任意の自然数。

D 塩基を示す。

B<sup>1</sup> 保護された塩基を示すが、通常はB<sup>4</sup>-ベンゾイルアデニン、N-イソブチリルグアニン、N<sup>6</sup>-ベンゾイルシトシンおよびチミン(すなわち保護不変)より選択される。

化合物(IV)の合成

式(IV)で示される化合物は、他の官能基部分が保護されたオリゴヌクレオチドの5'-水酸基延長上での保護された一級アミノ基の導入からなる目的的な任意の方法によって合成することができる。

化合物(IV)の合成法をその一実施例(第1図)について示せば、下記の通りである。第1図において、5'-水酸基化合物(0)にリン酸化剤(たとえば、ホスホジトリアゾリド、ホスホジクロリドまたはホスホペンゾトリアゾリド等)を作用させてリン酸化し、ついでアミノ基が保護されているアミノアルコール化合物(1)(この化合物はアミノアルキレンアルコール(R<sup>2</sup><sub>2</sub>-R<sup>1</sup>-OH)のアミノ基をR<sup>2</sup>で保護することにより得ることができる)を縮合させることにより化合物(II)を得る。

なお、化合物(0)はオリゴヌクレオチドであって、通常のオリゴヌクレオチド合成法で製造可能である。合成法としては、トリエステル法、ホスファイト法およびそれぞれの固相法および液相法がある。

一方、通常のオリゴヌクレオチド合成法、好ましくは本発明者らの固相合成法(Tetrahedron Letters 1979, 1635(1979)、Nucleic Acids Research 8, 5473(1980)、Nucleic Acids Research 8, 5491(1980)、Nucleic Acids Research 8, 5507(1980)、Nucleic Acids Research Symposium Series 7, 281(1980)に従って合成した化合物(III)の5'-末端を水酸化した化合物(III')と先に合成した化合物(II)とを縮合剤を用いて縮合させることにより化合物(IV)を得ることができる。縮合剤としてはトシルクロリド、メシチレンスルホニルクロリド、メシチレンスルホニルテトラゾリドおよびメシチレンスルホニルニトロトリアゾリド等があるが、メシチレンスルホニルニトロトリアゾリドが好ましい。なお、反応条件等の詳細は後記実験例を参照されたい。

化合物(V)の合成

化合物(V)は、上記化合物(IV)の保護基をすべて除去することによって得ることができる。

保護基COR<sup>4</sup>基、リン酸トリエステル中のオルト

クロロフェニル基および塩基部分のアシル基に、  
0.5 M のテトラメチルグアニジン・ビリジン - 2  
- カルボアミドキシムのジオキサン - 水 (9 : 1  
( $\frac{1}{4}$ )) 溶液で処理後、アルカリ処理 (アンモ  
ニア水) を行なうことにより除去される。R<sup>2</sup> がトリ  
フルオロアセチル基の場合に、アンモニア処理に  
より完全脱除されるが、オルトニトロフェニル  
スルフェニル基である場合にはメルカプトエタノール  
処理が必要である。R<sup>2</sup> として他の保護基を用いた  
場合には、オリゴヌクレオチド前体が安定な条件で、  
さらに別の処理を加えることも可能である。なお、  
デオキシオリゴリボヌクレオチドの合成法は既に  
各種のものが公知であって、保護基の種類および  
その組み入れし除きならびに融合その他について  
上記以外の詳細は既述の化学合成に関する成書や  
総説たとえば「ヌクレオチド・ヌクレオチドの合  
成」(丸井 1977 年)、「核酸有機化学」(化学同  
人 1979 年)、「核酸」(朝倉書店 1979 年)、  
Tetrahedron, 34, 31 (1978)、有合成、34, 723  
(1978) および化学の領域、33, 566 (1979) 等を

参照することができる。

# フ ロー チ ャート

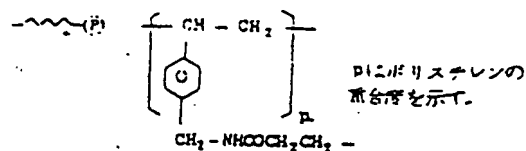
第 2 図のフローチャートに従って、本発明の化  
合物 (同図の化合物⑩) を製造した。

第 2 図で、記号は次の意味を持つ。

B' ベンゾイル化アデニン

B アデニン

DMTr ジメトキシトリチル



R<sup>0</sup> オルトクロロフェニル

Et エチル

CE - ジアノニチル

n 2

m 12

化合物 (V) (第 2 図の⑩) の合成

## 実験 1 - 1

ジメトキシトリチルアデノシン/樹脂 (①) (樹  
脂は担体に過ぎないが、樹脂に担持された目的化  
合物は外観的には樹脂そのものと変わらないので、  
樹脂に担持された当該化合物を以下において単に  
樹脂と呼ぶことにする) 300 mg (0.033 mmol)  
をイソプロパノール-塩化メチレン (15 : 85、  
V/V) 溶液 10 ml で 3 回洗浄後、臭化亜鉛の 1.0 M  
のイソプロパノール-塩化メチレン溶液 8 ml で 5  
分間ずつ 4 回反応 (脱トリチル化) をさせて樹脂 (②)  
を得る。樹脂 (②) をイソプロパノール-塩化  
メチレン溶液 10 ml で 3 回洗浄し、これにジヌクレ  
オチド (③) 150 mg (0.1 mmol) のビリジン溶液  
を添加後、煮沸させて系を無水とし、メシチレン  
スルホンニトロトリアゾリド (以下 MGMT と記  
す) 150 mg (0.5 mmol) と無水ビリジン 2 ml とを  
添加して 90 分間反応 (融合) をさせる。反応後、ビ  
リジン 10 ml で 3 回洗浄し、触媒量 (約 10 mg) のジ  
メチルアミノビリジン (以下 DMAF) を含む無水酢  
酸 - ビリジン (1 : 9、(V/V)) 溶液 10 ml を添加

し 10 分間反応させて未反応 5'-水酸基をアセチル  
化して保護し、これをビリジンで洗浄して、化合  
物 (④) (n=2) を得る。以上のような操作を 6  
回くり返して、化合物 (⑩) (n=12) を得る。

一方、5'-ヒドロキシ-ジヌクレオチド (⑤)  
800 mg (0.71 mmol) とオルトクロロフェニルホ  
スホジトリアゾリドとを従来のジオキサン溶液 (1.0  
mmol, 6 ml) 中で 2 時間反応させ、続いて  
トリフルオロアセチル-6-アミノヘキサノール  
300 mg (1.4 mmol) および 1-メチル-イミダ  
ゾール 115 mg (1.4 mmol) を加えてさらに 2 時間  
反応させる。反応終了後、溶液を真空し、残渣を  
クロホルムに溶解した後、水、0.5 M リン酸二  
水素ナトリウム水溶液、飽和炭酸水素ナトリウム  
水溶液および 5 % の塩化ナトリウム水溶液でそれ  
ぞれ洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥する。ク  
ロホルム層を蒸留後、シリカゲルカラムで精製  
(溶出液として 0-4 % のメタノール含有クロ  
ホルムを使用) し、溶出液を蒸留後ペンタン中に  
滴下し初末状の化合物 (⑥) を得る。

上記で合成した化合物(④) (2=12) 115 mg、  
(3.45 μmol) を前述と同様の方法で脱トリテル  
化したもの(⑤)に、化合物(⑤) 60 mg (0.04 μmol  
) をトリニテルアミン-ピリジン-水(1:3:  
1、V/V) 溶液 3 ml で処理(脱シアノニテル化)  
した化合物(⑥)を加え、無水にしたのち、MONT  
50 mg (0.2 μmol) およびピリジン 1 ml を加え 90 分  
間反応(加熱)させ、反応終了後ピリジンおよび  
メタノールで洗浄し、乾燥して、完全に保護され  
たオリゴヌクレオチド誘導体(⑦)を得る。

オリゴヌクレオチド誘導体(⑦) 15 mg を 0.5 M テ  
トラメチルグアニジン-ピリジン-2-カルボア  
ルデキシメイトのジオキサン-水(9:1、(V/V)  
溶液 200 μl を加え、反応管中、室温で 24 時間反応  
させる。反応後、濃アンモニア水(2.5 ml) を加  
えて密閉し、50℃で一晩反応させる。反応終了後、  
戸出し、戸液を濃硫酸、水に溶解させてからニー  
テルで抽出を行なう。水層を濃硫酸、セファデッ  
クス G-50 (φ1.5 × 120 cm、溶出液は 0.05 M の  
炭酸トリニテルアンモニウム緩衝液 pH 7.5) で

ーの結果を第 3-4、5-6 および 7-8 図に示  
す。これらの結果より、化合物(V) が生成してい  
ることがわかる。

#### 4. 図面の簡単な説明

第 1 図は、本発明の化合物を合成する方法の一  
例を示すフローチャートである。

第 2 図は、実験例で示した本化合物のフローチ  
ャートである。

第 3、5 および 7 図は、化合物(V) (それぞれ  
実験例 1-1、1-2 および 1-4) についての  
セファデックス G-50 での溶出パターンを示した  
ものである。

第 4、6 および 8 図は、化合物(V) (それぞれ  
実験例 1-1、1-2 および 1-4) についての  
高圧液体クロマトグラフィーの溶出パターンを示  
したものである。

高圧液体クロマトグラフィーで誘導体(⑧)を得  
た。

また、同様の方法で実験 1-2、1-3、1-  
4、1-5 および 1-6 のオリゴヌクレオチド誘  
導体を得た。実験例 1-1-1-6 の化合物の基  
基配列その他を第 1 表に示す。

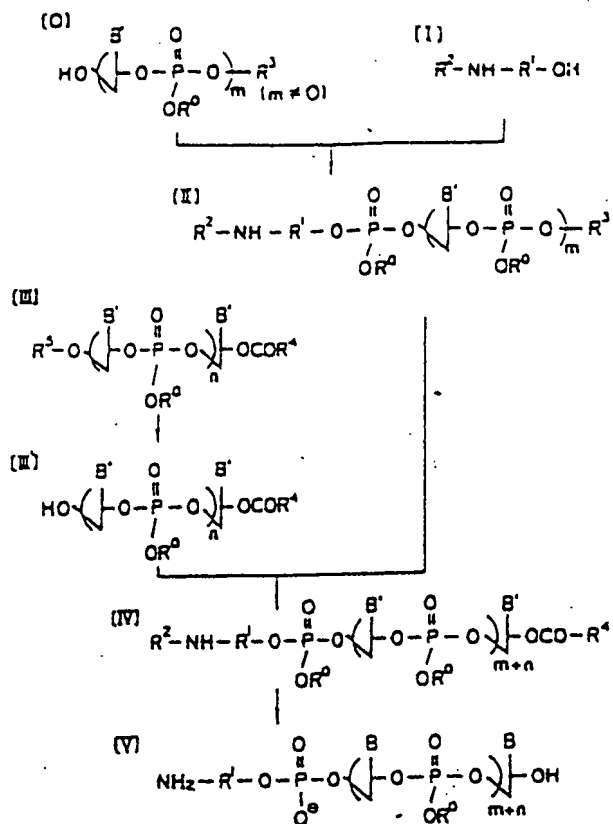
第 1 表

誘導体 番号	化合物(⑦)の内容		
	m+n	R <sup>1</sup>	(B) <sub>m+n</sub>
1-1	14	-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -	AAAAAAAAAAAAAAAA
1-2	14	-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -	TTTTTTTTTTTTTTTT
1-3	11	-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -	AAAAAAAAAAAAA
1-4	13	-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -	TTGGGAAAGCTTCCC
1-5	16	-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -	GGGAAAGCTTTCACATAA
1-6	16	-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -	GGGTCGACTAAAGCACT

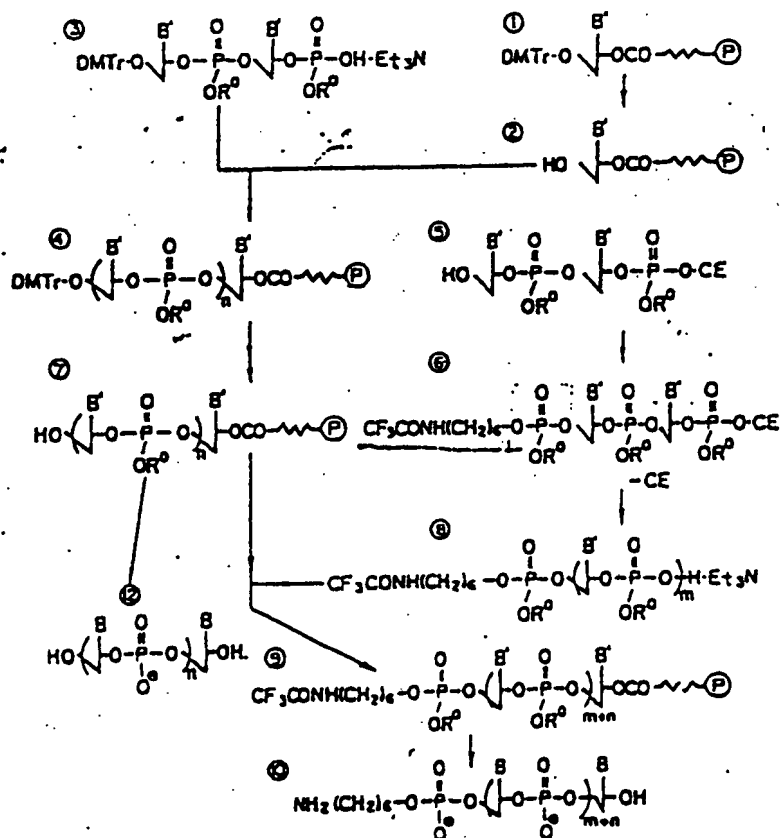
ただし、この表で A はアデニン、T はチミン、  
G はグアニン、C はシトシンを示す。

実験例 1-1、1-2 および 1-3 についての  
セファデックスおよび高圧液体クロマトグラフィー

第 1 图

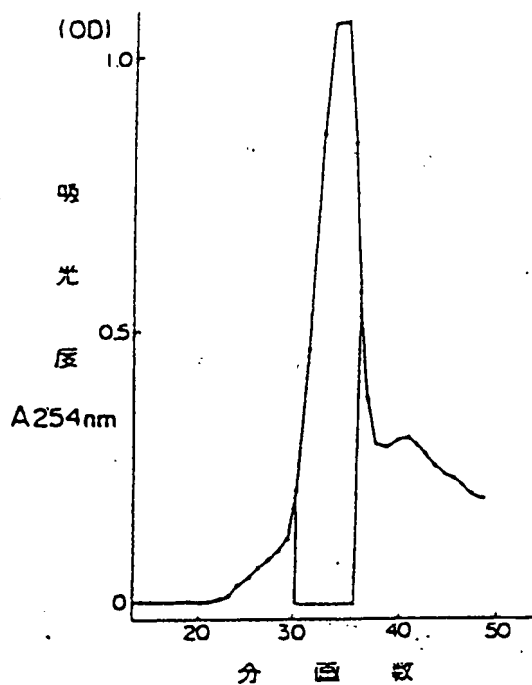


第 2 图

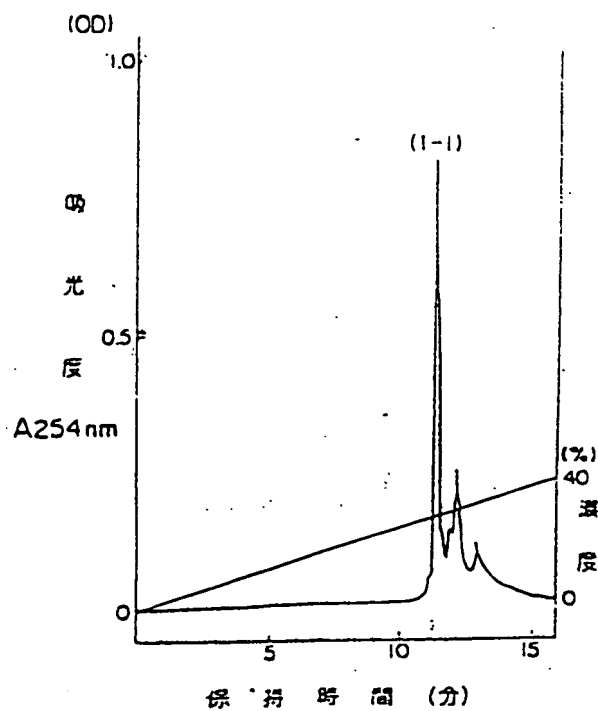




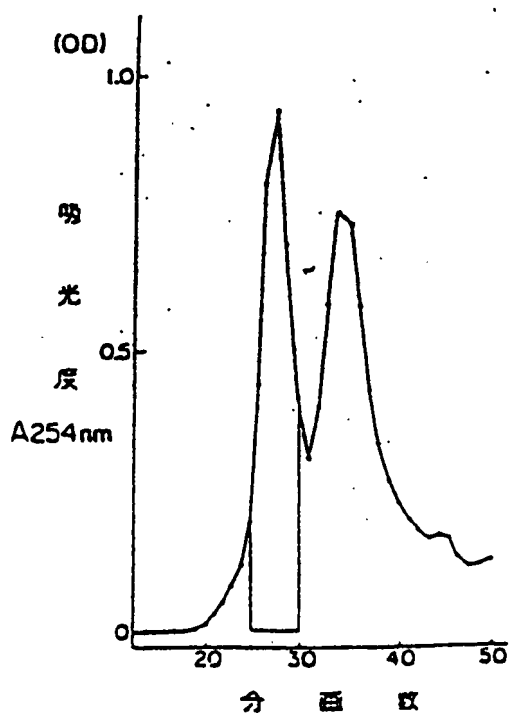
第3図



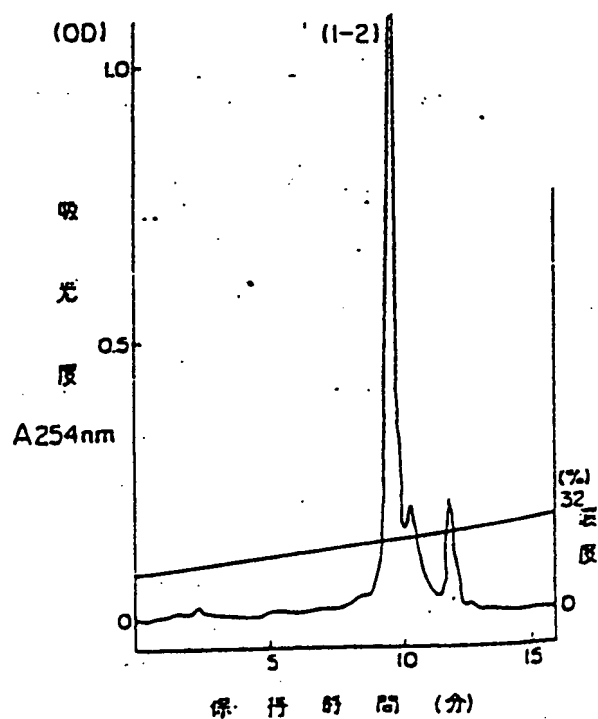
第4図



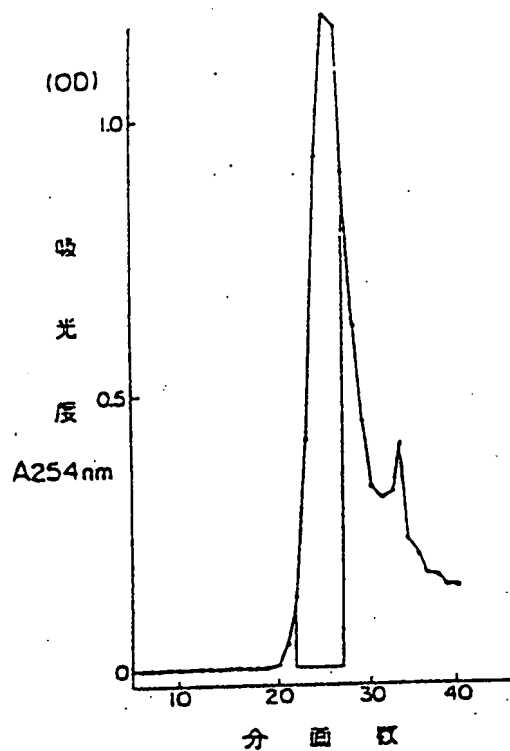
第5図



第6図



第7图



第8图

